

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Umum Tanaman *Limonia acidissima* Linn

Kinca atau *Limonia acidissima* merupakan jenis tanaman dalam suku jeruk-jerukan (*Rutaceae*). Tanaman ini masih kerabat dekat dengan maja, yaitu sejenis jeruk-jerukan yang berasal dari Asia tropika dan subtoprika. Menurut Jones (1992) diacu dalam Sukamto (1999), tanaman ini dahulunya berasal dari India terutama di daerah-daerah kering. Selain tumbuh subur di daerah kering India, tanaman ini diperkirakan pula tumbuh subur di daerah-daerah lain seperti Srilanka, Myanmar, dan Indo-China. Kemudian menyebar ke Malaysia dan Indonesia. Tanaman ini biasanya tumbuh di daerah *tropic mushon* yang sewaktu-waktu mengalami musim kering. Menurut Sukamto (1999), tanaman ini mempunyai adaptasi yang baik pada daerah yang kering dan tanah yang berpasir. Di Indonesia, kinca (*Limonia acidissima* L.) umumnya ditanam di pekarangan pada daerah pantai, dipadang-padang rumput yang kering terutama dekat laut.

##### 2.1.1 Taksonomi

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Famili	: Rutaceae
Genus	: <i>Limonia</i>
Spesies	: <i>Limonia acidissima</i> . (Qureshi, 2010)



**Gambar 2. 1** Kinca (*Limonia acidissima* Linn.) (Dalimartha, 2003).

### 2.1.2 Sinonim

Penyerbaran tanaman *Limonia acidissima* L. di berbagai wilayah menjadikan tanaman ini memiliki nama-nama yang berbeda tergantung pada daerahnya masing-masing, seperti olifantsappel (Belanda), *wood-apple* (Inggris), maja (Jakarta), kawista (Sunda), kinca (Jawa), karabista (Madura) (Sukanto, 1999). *Limonia acidissima* termasuk dalam family Rutaceae yang mempunyai nama latin *Limonia swingle*, *Feronia elephanthus correa*, *Schinus limonia* Linn dan juga ada nama lain diantaranya Wood apple dan Elephant apple (Kumawat dkk, 2012 ; Padkey dkk, 2014).

### 2.1.3 Morfologi

1. Daun : Bentuk daun kinca yaitu menyirip dengan jumlah 5 sampai 7 sirip daun. Daun kinca memiliki panjang 25-35 mm dan memiliki lebar 10-20 mm.
2. Kulit Pohon : Pohon kinca ini mempunyai kulit yang berserat (Shermin dkk, 2012).
3. buah: Kinca memiliki buah yang berbentuk bulat dengan diameter 5-9 cm. Memiliki kulit buah keras yang sulit untuk membuka serta mempunyai daging buah berwarna putih kekuningan ketika belum matang dan berwarna coklat ketika matang serta mempunyai biji kecil (Shermin dkk, 2012).
4. Kandungan kinca : buah kinca mengandung beberapa zat kimia seperti flavonoid, glikosida, saponin, tannin, kumarin dan turunan tyramin (Shermin dkk, 2012).
5. Habitat dan bentuk pohon: Tanaman kinca ini banyak tumbuh di daerah India. Pohon kinca mempunyai pohon yang tinggi dan lebar, tingginya

mampu mencapai 9 meter. Tanaman ini hanya bisa tumbuh pada iklim yang kering dan hangat serta mempunyai kulit kasar dan berduri (Shermin dkk, 2012).

#### **2.1.4 Habitat dan Distribusi Geografis**

Tanaman Kinca (*Limolia acidissima* L.) tidak membutuhkan persyaratan tumbuh tertentu. Tanaman ini dapat tumbuh liar di hutan, atau ditanam pekarangan yang lapisan tanahnya kering dan berpasir. Tanaman ini umumnya tumbuh di daerah tropis dan merupakan tanaman yang biasa hidup di dataran rendah atau daerah pantai serta mampu tumbuh hingga pada ketinggian 400 m dpl.

#### **2.1.5 Kandungan Senyawa *Limolia acidissima* L.**

Dalam dunia pengobatan, tanaman *Limonia acidissima* L. telah lama diketahui banyak manfaat yaitu sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit. Buahnya dapat dimanfaatkan sebagai sirup minuman, jelly, dan selai. Bagian lainnya yang tak kalah pentingnya yaitu bagian akar, kulit dan daun yang digunakan untuk menyembuhkan penyakit kudis dan dapat menghilangkan gas berlebih yang ada dalam perut. Biji dari buah mentah yang telah dihaluskan juga berkhasiat untuk pengobatan disentri dan diare (Pandery, 2014).

Tanaman *Limonia acidissima* L. merupakan salah satu tanaman yang memiliki manfaat sebagai obat tradisional. Menurut Ilango *et al.* (2012) pada bagian buah dapat digunakan dalam pengobatan tumor, asma, sembelit, lemah jantung dan hepatitis. Hasil penelitian menyatakan bahwa buah kinca mengandung flavonoid, glikosida, saponin, tanin, kumarin dan turunan tiramin. Selain berpotensi sebagai antioksidan, buah kinca juga berpotensi sebagai antidiabetes serta daunnya sebagai hepatoprotektif. Pada cangkang buah dilaporkan memiliki senyawa anti jamur, yaitu psoralena. Kulit batang tanaman menghasilkan senyawa alkaloid, kumarin, flavanon, lignan, sterol dan triterpen yang ditemukan memiliki aktivitas antimikroba. Daunnya memiliki aroma wangi seperti jeruk bila diremas. Daun *Limonia acidissima* L. diketahui mengandung senyawa flavonoid, tannin, dan alkaloid yang dapat menghambat pertumbuhan

*Staphylococcus aureus*, ini juga mengandung zat kimia antara lain stigmasterol, psoralen, bergapten, orientin, vitamin, tanin dan minyak esensial (Panda, 2013).

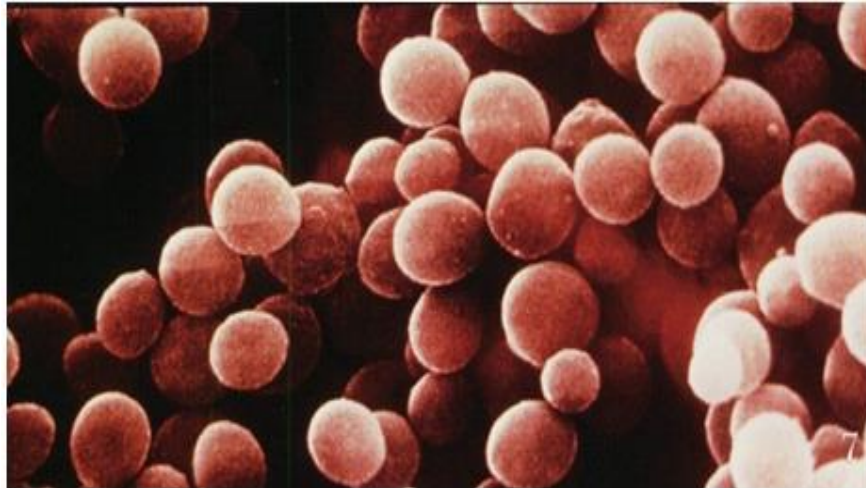
## 2.2 Tinjauan Umum *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* atau dikenal dengan *S. aureus* adalah bakteri fakultatif anaerob gram positif yang muncul sebagai cluster seperti anggur ketika dilihat melalui mikroskop, biasanya akan tampak seperti koloni dengan warna kuning keemasan, biasanya juga akan tampak seperti hemolysis ketiak tumpuh pada piring agar darah. Beberapa strain *S. aureus* mampu menghasilkan staphyloxanthin pigmen karotenoid berwarna emas. Koloni mutan cepat mati bila terkena neutrophil manusia, sementara banyak koloni berpigmen yang mampu beradaptasi dan bertahan hidup pada kondisi tertentu (Jawetz et al., 2007).

Bakteri *staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif, dimana dinding selnya terdiri dari peptidoglikan yang sangat tebal serta memiliki membran sel selapis dan memberikan kekakuan untuk mempertahankan keutuhan sel. Selnya memiliki diameter 0,8 – 1,0 µm. Bakteri *S aureus* merupakan flora normal yang terdapat pada kulit, saluran pernapasan dan saluran cerna pada manusia. Genus *Staphylococcus* yang paling patogen adalah *Staphlococcus aureus*. Bakteri *S aureus* merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi pada kulit manusia (Jawetz et al., 2007).

### 2.2.1 Taksonomi

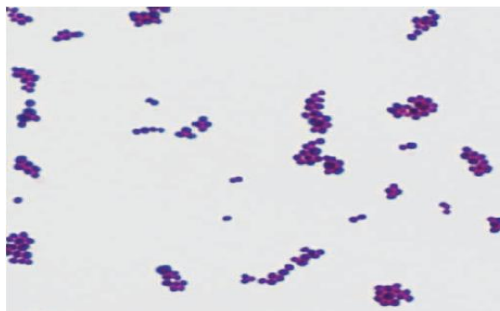
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Todar, 2012).



**Gambar 2. 2** *Staphylococcus aureus* dengan mikroskop elektron (Todar, 2012).

### 2.2.2 Morfologi Dan Sifat

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif, sel berbentuk bola dengan diameter 1  $\mu\text{m}$ , bergerombol tidak beraturan seperti buah anggur (gambar 2.4). Bakteri *S aureus* merupakan koagulase positif dan merupakan patogen utama pada manusia yang biasanya terjadi seperti keracunan makanan, infeksi kulit ringan sampai infeksi parah yang dapat mengancam jiwa. Bakteri ini tumbuh dengan mudah pada sebagian besar media bakteriologis dibawah kondisi aerobik/mikroaerofilik. Tumbuh paling cepat pada suhu 37 °C, tetapi untuk bentuk pigmen terbaik terjadi pada suhu 20-25 °C. *S aureus* umumnya membentuk koloni berwarna abu – abu sampai warna kuning tua keemasan pada bagian tubuhnya (Jawtz et al., 2013)



**Gambar 2. 3** *Staphylococcus aureus* Gram positif cocci berpasangan, tetrad, dan berkelompok. Perbesaran 1000x (Jawetz et al., 2013)

### 2.2.3 Enzim dan Toksin

*Staphylococcus* dapat menyebabkan penyakit pada tubuh karena mampu berkembang biak dan menyebar luas di jaringan, serta adanya beberapa zat yang di produksi, diantaranya :

#### 2.2.3.1 Katalase

*Staphylococcus* menghasilkan katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Tes katalase juga digunakan untuk membedakan *staphylococcus* yang negatif (Jawetz et al., 2013).

#### 2.2.3.2 Koagulase dan Faktor Penggumpalan

*Staphylococcus* menghasilkan koagulase, suatu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan oksalat atau plasma sitrat. Koagulase mengikat protrombin yang akan menjadi enzimatis aktif dan memulai polimerisasi fibrin. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap identik dengan potensi patogen invasif. Faktor penggumpalan bertanggung jawab untuk kepatuhan dari organisme untuk fibrinogen dan fibrin. Bila dicampur dengan plasma *staphylococcus aureus* akan membentuk gumpalan. Faktor penggumpalan berbeda dengan koagulase. Pada faktor penggumpalan menginduksi respon imunogenik kuat dalam *host* (Jawetz et al., 2013).

#### 2.2.3.3 Enzim lainnya

Enzim lainnya yang dihasilkan oleh *staphylococcus* termasuk hyaluronidase atau factor penyebaran pada stafilokinase mengakibatkan fibrinolysis namun dapat bertindak jauh lebih lambat daripada skriptokinase, proteinase, lipase dan  $\beta$ -laktamase (Jawetz et al., 2013)

#### 2.2.3.4 Hemolisin

$\alpha$ -hemolisin merupakan protein heterogen yang bekerja pada spektrum luas dari sel membran eukariotik. *B-toxin* dapat merusak sphingomyelin, yaitu racun bagi banyak jenis sel, serta termasuk sel-sel darah merah pada manusia. *A-toxin* adalah heterogen dan terurai menjadi sub unit dalam deterjen nonionik yang dapat mengganggu membran biologis dan mungkin memiliki peran dalam penyakit diare yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.  $\gamma$ -hemolysin adalah leukosidin sel darah putih yang lisis dan terdiri dari dua protein yaitu S dan F.  $\gamma$ -

*hemolysin* dapat berinteraksi dengan dua protein yang terdiri dari *panton-valentine leukocidin*. Keenam toksin protein ini mampu efisien melisis sel darah putih dengan menyebabkan pembentukan pori di sel membran yang meningkatkan permeabilitas kation. Hal ini menyebabkan pelepasan mediator inflamasi seperti IL-8, leukotrien, dan histamin, yang bertanggung jawab untuk nekrosis dan peradangan yang parah (Jawetz *et al.*, 2013).

### **2.2.3.5 Panton-Valentine Leukocidin**

Toksin dari *Staphylococcus aureus* memiliki dua komponen, dan tidak seperti hemolisins kromosom seperti yang disebutkan diatas. Hal ini dapat membunuh sel-sel darah putih manusia dan kelinci. Dua komponen tersebut adalah S dan F bertindak sinergis pada membran sel darah putih seperti yang diuraikan pada toksin  $\gamma$ . Toksin ini merupakan faktor virulensi penting dalam infeksi CA-MRSA (Jawetz *et al.*, 2013).

### **2.2.3.6 Toksin Eksfoliatif**

Toksin dari epidemolitis dari *Staphylococcus aureus* adalah dua protein yang berbeda dari berat molekul yang sama. Eksfoliatif toksin A dikodekan oleh ETA yang terletak di fag dan stabil panas. Eksfoliatif B adalah plasmid dimediasi dan labil terhadap panas (Jawetz *et al.*, 2013).

### **2.2.3.7 Toxic Shock Syndrome Toxin**

Beberapa strain *Staphylococcus aureus* diisolasi dari pasien dengan sindrom syok toksik menghasilkan toksin yang disebut Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1) yang sama dengan enterotoksin F. TSST-1 mengikat molekul kelas histocompatibility (MHC) kelas II. Menghasilkan stimulasi sel T. Toksin ini berhubungan dengan demam, shock, dan keterlibatan multisistem, termasuk ruam kulit (Jawetz *et al.*, 2013).

### **2.2.3.8 Enterotoksin**

Enzim lainnya yang dihasilkan oleh *staphylococcus* termasuk hyaluronidase atau factor penyebaran pada stafilokinase mengakibatkan fibrinolysis namun dapat bertindak jauh lebih lambat daripada skriptokinase, proteinase, lipase dan  $\beta$ -laktamase (Jawetz *et al.*, 2013).

Beberapa enterotoksin diantaranya (A-E. G-J. K-R. U-V). Enterotoksin mirip dengan TSST-1 dihasilkan sekitar 50% oleh *staphylococcus aureus*.

Enterotoksin stabil terhadap panas dan tahan terhadap enzim usus dan merupakan penyebab penting dari keracunan makanan. Enterotoksin diproduksi saat *staphylococcus aureus* berada di karbohidrat dan protein pada makanan. Perlu diketahui bahwa menelan 25 µg enterotoksin B dapat menyebabkan muntah dan diare (Jawetz et al., 2013)

#### 2.2.4 Patogenesis Dan Patologi

*Staphylococcus aureus* terdapat pada rongga hidung sekitar 20-50% pada manusia. Patogenesisnya merupakan efek gabungan dari berbagai macam metabolit yang dihasilkannya. *Staphylococcus aureus* bersifat invasif serta menghasilkan koagulase, cenderung menghasilkan pigmen kuning dan menjadi hemolitik (Jawetz et al., 2013).

*Staphylococcus aureus* yang terdapat pada folikel rambut dapat menyebabkan nekrosis jaringan. Terjadi kolagulase fibrin disekitar lesi dan limfatik mengakibatkan pembentukan dinding yang membatasi proses dan diperkuat oleh akumulasi sel-sel inflamasi dan kemudian jaringan fibrosa. *Staphylococcus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis, atau sepsis dengan supurasi di setiap organ (Jawetz et al., 2013).

#### 2.3 Tinjauan Umum Infeksi

Infeksi adalah suatu keadaan masuknya mikroorganisme ke dalam tubuh. Transmisi infeksi terjadi dikarenakan untuk menjamin kelangsungan hidup bakteri dan meningkatkan kemungkinan penularan dengan memproduksi infeksi tanpa gejala atau penyakit ringan daripada kematian dari *host*, mikroorganisme yang biasanya hidup pada orang meningkatkan kemungkinan penularan dari satu orang ke orang lain. Beberapa bakteri yang sering menyebabkan penyakit pada manusia ada terutama pada hewan dan menginfeksi manusia. Banyak bakteri yang ditularkan dari tangan satu orang ke orang lain melalui tangan. Mencuci tangan merupakan komponen penting dari pengendalian infeksi. (Jawetz, 2016).

Proses Infeksi di dalam tubuh, kebanyakan bakteri menyebabkan penyakit mengikuti sel inang atau biasanya sel-sel epitel. Setelah bakteri telah menetapkan tempat utama infeksi, mereka berkembang biak dan menyebar langsung melalui jaringan atau melalui sistem limfatik ke aliran darah. Infeksi ini (bakteremia)



dapat terjadi sementara atau persisten. Bakteremia memungkinkan bakteri menyebar luas dalam tubuh dan memungkinkan untuk mencapai jaringan yang sangat cocok untuk pertumbuhan (Jawetz, 2016).

Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, parasit atau jamur (WHO, 2014). Penggunaan antibakteri untuk menangani penyakit infeksi harus merupakan zat yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri patogen tetapi tanpa membahayakan manusia. Selain efektif membunuh bakteri patogen juga harus memiliki selektifitas karena akan berbahaya jika suatu antibakteri tidak memiliki selektifitas. Oleh karena itu pemilihan antibakteri juga harus memperhatikan jenis bakteri yang akan dibunuh. Secara umum penyakit infeksi dapat disembuhkan dengan mengkonsumsi antibiotik. Sekitar 80% konsumsi antibiotik dipakai untuk kepentingan manusia dan sedikitnya 40% berdasar indikasi yang kurang tepat, misalnya infeksi virus seperti influenza, hepatitis, ataupun demam berdarah dengue (Utami, 2012).

## 2.4 Tinjauan Tentang Antibiotik

Antibiotik pada awalnya didefinisikan sebagai zat yang diproduksi oleh salah satu mikroorganisme yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Antibiotik diproduksi sepenuhnya atau sebagian oleh sintesis kimia yang dalam konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya (Craig, 2001).

Antibiotika adalah zat-zat kimia yang dihasilkan oleh fungi dan bakteri, yang memiliki khasiat mematikan atau menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan toksisitasnya bagi manusia relatif kecil. Turunan zat-zat ini yang dibuat secara semi-sintetis, juga termasuk kelompok ini, begitu pula semua senyawa sintetis dengan khasiat antibakteri (Tjay et al., 2007).

Ada tiga sumber utama dari mana antibiotik diperoleh, yaitu : (Craig, 2001).

### (1) Mikroorganisme

Misalnya, bacitracin dan polimiksin diperoleh dari beberapa spesies *Bacillus*; streptomisin, tetrasiklin, gentamisin dari *Micromonospora purpurea*; griseofulvin dan beberapa penisilin dan sefalosporin dari generasi tertentu (*Penicillium*, *Acremonium*) dari keluarga Aspergillacea dan monobaktam dari

spesies *Pseudomonas acidophila* dan *Gluconobacter*. Kebanyakan antibiotik digunakan saat ini telah dihasilkan dari *Streptomyces* spp.

## (2) Sintesis

Kloramfenikol sekarang biasanya dihasilkan oleh proses sintesis. Ini berarti bahwa bagian dari molekul yang dihasilkan oleh proses fermentasi menggunakan mikroorganisme yang tepat dan produk kemudian dimodifikasi lebih lanjut oleh proses kimia penisilin dan sefalosporin diproduksi dengan metode ini (Craig, 2001).

Pengukuran aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Kedua konsentrasi ini telah dilakukan Pengukuran aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Kedua konsentrasi ini telah menjadi parameter utama yang digunakan untuk mengukur aktivitas *in vitro* antimikroba terhadap berbagai patogen. Meskipun KHM dan KBM sangat baik prediktor potensi antimikroba terhadap organisme yang menginfeksi. Sebagai contoh, KBM memberikan informasi konsentrasi minimal pada tingkat bakterisida (daya bunuh) pada aktivitas fungisida dan apakah pembunuhan dapat ditingkatkan dengan lebih tinggi konsentrasi obat. Selain itu, KHM memberikan informasi pada efek penghambatan bakteri yang setelah paparan antimikroba (Craig, 2001). Berdasarkan sifatnya antibiotik dapat dibagi menjadi beberapa kategori, yaitu : (Jawetz, 2012)

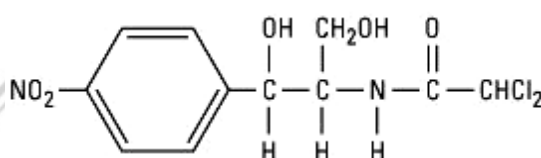
- (1) Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel yang terganggu akan menyebabkan dinding sel menjadi rapuh dan mengakibatkan pecah.
- (2) Antibiotik yang menghambat fungsi membran sel.
- (3) Antibiotik yang menghambat sintesis protein (yaitu inhibisi, translasi, dan transkripsi bahan genetik).
- (4) Antibiotik yang menghambat sintesis nukleat.

Secara umum penyakit infeksi dapat disembuhkan dengan mengonsumsi antibiotik. Sebagian besar infeksi akibat bakteri *S. aureus* sudah resisten terhadap

berbagai antibiotik, sehingga perlu diberikan antibiotik berspektrum lebih luas seperti kloramfenikol (Jawetz *et al.*, 2007).

Kloramfenikol diisolasi dari *Streptomyces venezuelae* namun kini telah disintesis secara kimia dan memiliki spektrum kerja seperti tetrasiklin, akan tetapi keduanya tidak memiliki resistensi silang. Kloramfenikol berkhasiat sebagai antibiotika *broad spectrum* (spektrum luas) dan bersifat bakteriostatik untuk sebagian bakteri Gram positif dan Gram negatif serta bersifat bakterisid untuk beberapa bakteri lainnya (Tjay *et al.*, 2007)

Kristal kloramfenikol adalah netral, senyawa stabil dengan struktur berikut:



**Gambar 2. 4** Struktur Kloramfenikol (Anonim, 2009).

Mekanisme kloramfenikol menghambat sintesis protein bakteri, pada tingkat lebih rendah di sel eukariotik. Antibiotik ini dapat mengikat secara reversibel pada 50S subunit ribosom (dekat tempat pengikatan untuk antibiotik macrolide dan klindamisin). Obat mencegah pengikatan asam amino yang mengandung hasil akhir aminoasil tRNA ke situs akseptor pada ribosom 50S subunit. Interaksi antara peptidyltransferase dan substrat asam amino diblokir, menghambat pembentukan ikatan peptida (Anonim, 2009). Kristal kloramfenikol adalah senyawa yang stabil yang cepat diserap dari saluran pencernaan, secara luas didistribusikan ke dalam jaringan dan cairan tubuh, termasuk SSP dan CSF; menembus sel dengan baik. Umumnya ekskresi terjadi di urin, 90% dalam bentuk tidak aktif (Jawetz, 2016). Efek samping serius yang dapat ditimbulkan oleh kloramfenikol adalah kerusakan pada sumsum tulang sehingga penggunaannya dibatasi hanya untuk kasus-kasus tertentu seperti meningitis dan tifus. Selain itu penggunaannya tidak boleh lebih dari 2 minggu (Tjay *et al.*, 2007).

**Tabel 2.1** Kriteria diameter zona hambat Kloramfenikol (CLSI, 2015).

Agen	Konsentrasi/disk	Kriteria zona hambat (mm)		
		Sensitif	Intermediet	Resisten
Kloramfenikol	30 µg/disk	>18 mm	13-17 mm	<12 mm

## 2.5 Tinjauan senyawa metabolit sekunder tanaman *Limolia acidissima* L.

Komponen senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antibakteri :

### 1. Alkaloid

Alkaloid dapat merusak peptidoglikan pada sel bakteri yang menyebabkan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Juliantina, 2008). Di dalam alkaloid terdapat basa nitrogen yang dapat bereaksi dengan asam amino yang menyusun dinding bakteri dan DNA bakteri. Reaksi tersebut mengakibatkan perubahan genetik pada DNA bakteri sehingga mengalami kerusakan dan terjadi lisis pada sel bakteri dan menyebabkan bakteri mati (Gunawan, 2009).

### 2. Steroid

Steroid sebagai antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran sel berubah dan akhirnya menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Cowan, 2009)

### 3. Triterpenoid

Triterpenoid bekerja dengan cara bereaksi dengan protein transmembran pada membran luar dinding sel bakteri membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga menyebabkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa yang akan mengurangi permeabilitas dinding sel, akibatnya sel bakteri akan kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhannya akan terhambat dan mati (Stefanovic et al, 2012).

### 4. Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang banyak terdapat di alam. Senyawa Flavonoid telah dilaporkan berfungsi sebagai antibakteri (Gholib, 2009). Flavonoid bekerja dengan cara denaturasi protein, mengganggu lapisan lipid dan mengakibatkan kerusakan dinding sel. mengakibatkan kerusakan dinding sel. Hal tersebut dapat terjadi karena *flavonoid* bersifat lipofilik sehingga akan mengikat fosfolipid-fosfolipid pada membran sel jamur dan mengganggu permeabilitas membran sel (Watson, 2007). Mekanisme antibakteri dari senyawa metabolit sekunder flavonoid yaitu bekerja dengan cara penghambatan sintesis

asam nuklet, penghambatan fungsi dari membran sitoplasma dan penghambatan metabolisme energi sehingga menyebabkan bakteri tidak dapat tumbuh dan bereproduksi (Lamb and Chusnie, 2005).

## 5. Tanin

Tanin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Senyawa tanin ini banyak dijumpai pada tumbuhan. Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. (Ajizah, 2004).

### 2.6 Tinjauan Tentang Ekstrak

Ekstrak merupakan sediaan kental yang diperoleh dengan cara mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI., 1995).

### 2.7 Tinjauan Tentang Ekstraksi

#### 2.7.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi menurut istilah kefarmasian meliputi pemisahan bagian zat aktif dari tumbuhan atau jaringan tubuh hewan dari komponen zat aktif maupun inert dengan menggunakan pelarut yang selektif pada prosedur standar ekstrak. Produk yang diperoleh dari tanaman berupa cairan yang relatif tidak murni, semisolid atau bubuk yang ditujukan hanya untuk penggunaan oral (Handa *et al.* 2008).

#### 2.7.2 Pembuatan Serbuk Simplisia Dan Klasifikasinya

Proses awal pembuatan ekstrak merupakan tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan). Dari simplisia dibuat menjadi serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar beberapa hal sebagai berikut : (Depkes RI., 2000)

1. Semakin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif dan efisien, namun semakin halus suatu serbuk, maka semakin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.
2. Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dll.) maka akan timbul panas yang dapat mempengaruhi pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat di kompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

### **2.7.3 Maserasi**

Merupakan metode yang pada umumnya digunakan untuk proses ekstraksi tanaman obat. Pada proses ini, seluruh atau serbuk simplisia kasar ditempatkan dalam wadah tertutup dengan penambahan pelarut dan didiamkan pada suhu kamar pada jangka waktu minimal 3 hari dengan sering dilakukan pengadukan sampai semua terlarut. Campuran kemudian disaring (Handa *et al.*, 2008).

### **2.7.4 Maserasi Kinetik**

Maserasi kinetik merupakan maserasi yang dilakukan dengan pengadukan secara kontinyu (terus menerus) pada kecepatan yang konstan : (Depkes RI., 2000). Pada penelitian yang dilakukan fauzana (2010), dilakukan maserasi kinetik dengan kecepatan 200 rpm, serta diperoleh nilai rendemen pada interval 12.20% hingga 12.60% dimana rendemen tertinggi diperoleh pada lama waktu maserasi 24 jam yaitu sebesar 12.59%. Nilai rendemen terendah diperoleh pada lama waktu maserasi 8 jam yaitu sebesar 12.22%.

### **2.7.5 Remaserasi**

Remaserasi merupakan proses dilakukannya pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan pada maserat pertama dan seterusnya (Depkes RI., 2000).

## **2.8 Tinjauan pelarut**

Pelarut merupakan suatu zat yang dapat digunakan untuk melarutkan zat lain atau suatu obat dalam preparat larutan (Ansel 2005).

Cairan pelarut yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang

aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka cairan pelarut yang dipilih yang bisa melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung.

Pada prinsipnya cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi "*pharmaceutical grade*". Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya. Jenis pelarut lain seperti metanol dll. (alkohol turunannya), heksana dll. (hidrokarbon aliphatik), toluen dll. (hidrokarbon aromatik), kloroform (dan seolongannya), aseton, umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (fraksinasi). Khusus metanol, dihindari penggunaannya karena sifatnya yang toksik akut dan kronik, namun demikian jika dalam uji ada sisa pelarut dalam ekstrak menunjukkan negatif, maka metanol sebenarnya pelarut yang lebih baik dari etanol (Depkes RI., 2000).

### **2.8.1 N-Heksan**

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia  $C_6H_{14}$ . Awalan heks- merujuk pada enam atom karbon yang terdapat pada heksana dan akhiran -ana berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. N-heksana merupakan jenis pelarut organik. Fungsi dari heksana adalah untuk mengekstraksi lemak atau untuk melarutkan lemak, sehingga merubah warna dari kuning menjadi jernih (Mahmudi 1997).

- Rumus molekul :  $C_6H_{14}$
- Berat molekul :  $86,18 \text{ gr mol}^{-1}$
- Penampilan : Cairan tidak berwarna
- Densitas :  $0,6548 \text{ gr/mL}$
- Titik lebur :  $-95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $178 \text{ K}$ ,  $-139 \text{ }^{\circ}\text{F}$
- Titik didih :  $69 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $342 \text{ K}$ ,  $156 \text{ }^{\circ}\text{F}$
- Kelarutan dalam air :  $13 \text{ mg/L}$  pada  $20^{\circ}\text{C}$
- Viskositas :  $0,294 \text{ cP}$
- Titik nyala :  $-23,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- Suhu menyala sendiri :  $233,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . (Anshari 2014)

## 2.9 Tinjauan Tentang Uji Kepekaan Terhadap Antimikroba Secara In Vitro

Test kepekaan terhadap antimikroba merupakan penentuan terhadap bakteri penyebab penyakit yang kemungkinan menunjukkan resistensi terhadap suatu antimikroba atau kemampuan suatu antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang tumbuh secara *in vitro*, sehingga dapat dipilih sebagai antimikroba yang dapat berpotensi untuk pengobatan (Soleha, 2015).

Tujuan dari uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara *in vitro* yaitu untuk mengetahui obat anti mikroba yang masih dapat digunakan. Penentuan kepekaan bakteri patogen dapat dilakukan dengan metode difusi, metode dilusi, dan uji bioautografi (Dzen. 2003). Alasan dilakukan uji kepekaan antimikroba adalah untuk mendapatkan agen antimikroba yang tepat untuk pengobatan penyakit infeksi tertentu. Soleha (2015)

### 2.9.1 Metode Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram yaitu obat dijenuhkan dalam kertas saring (cakram kertas). Dimana cakram kertas yang mengandung obat tertentu ditanam pada media pembenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasikan  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Selanjutnya amati adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Metode ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik dan kimia, selain dari faktor obat dan organisme (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekul dan stabilitas obat) (Dzen *et al.*, 2003).



Pada metode ini yang diamati adalah diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman karena difusinya obat ini titik awal pemberian ke daerah difusi sebanding dengan kadar obat yang diberikan. Metode ini dilakukan dengan cara menanam kuman pada media agar padat tertentu kemudian diletakkan kertas samir atau disk yang mengandung obat atau dapat juga dibuat sumuran kemudian diisi obat dan dilihat hasilnya (Jawetz et al., 2012).

Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu obat ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi pada permukaan dengan organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu. Metode tersebut dipengaruhi banyak faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antar obat dan organisme (misal : sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular, dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi keadaan memungkinkan penentuan kerentanan organisme (Jawetz et al., 2012).

Tahapan dalam metode pengujian difusi cakram : (Lesmana, 2006).

- (1) Pertama – tama yang lakukan adalah dengan membuat biakan kuman yang berumur 24 jam yang telah murni dan telah diketahui identitasnya dalam 0,5 ml kaldu brain heart infusion (BHI). Biakan kaldu dibuat tipis mungkin.
- (2) Tahapan kedua yaitu melakukan proses inkubasi pada suhu 35°C sampai mencapai kekeruhan yang sesuai dengan standar MacFarland 0,5 (biasanya setelah 2-6 jam). Pada kekeruhan ini jumlah kuman di biakan kaldu sekitar 1 sampai  $2 \times 10^8$  CFU/ml.
- (3) Tahapan ketiga yaitu secara visual dengan melakukan Penyesuaian kekeruhan dengan menambahkan larutan NaCl pada biakan kaldu atau dengan cara lainnya yaitu dengan membuat suspensi kuman dari biakan pada lempeng agar non-selektif (agar darah) yang berumur 18-24 jam dalam larutan garam faal dan menyesuaikan kekeruhannya setara dengan standar MacFarland 0,5.
- (4) Tahapan keempat yaitu 15 menit setelah dilakukan penyesuaian kekeruhan suspensi kuman di ambil dengan menggunakan kapas lidi steril. Kapas lidi diputar-putar beberapa kali dan kemudian ditekan ke dinding bagian dalam tabung untuk menghilangkan kelebihan inokulum dari biakan kaldu. Kemudian

kapas lidi kemudian ditanamkan lempengan agar Mueller-Hinton (ukuran lempeng petri = 100 x 15 mm) dengan cara mengusapkan (streak) pada seluruh permukaan lempeng agar. Prosedur ini diulang sebanyak dua kali lagi dengan setiap kali memutar posisi lempeng agar 180° agar supaya permukaan terinokulasi dengan rata.

- (5) Tahapan kelima yaitu seluruh tepi agar diusap dan Lempeng agar yang telah ditanami (diinokulasi) dibiarkan inokulum pada permukaan agar serta untuk Sejumlah cakram antibiotik disiapkan untuk pengujian. Cakram-cakram antibiotik dapat diletakkan satu demi satu diatas agar biakan secara manual.
- (6) Tahap keenam yaitu setelah diletakkan di atas biakan maka cakram - cakram antibiotik ditekan perlahan-lahan dengan pinset untuk memastikan seluruh permukaan bersentuhan sempurna dengan permukaan agar yang mengandung biakan kuman. Untuk tahap ini biasanya 5 buah cakram diletakkan pada lempeng agar 100 mm atau 12 cakram pada lempeng 150 mm kemudian lempeng agar dibalik dan dalam waktu tidak lebih dari 30 menit diinkubasikan secara aerob pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Untuk hasil akhirnya dapat diukur berapa zona hambat yang dapat dijadikan sebagai tolak ukur yang menghasilkan efek antibakteri yang dapat dilihat dari biakan tersebut.

Kelebihan dari menggunakan metode difusi cakram ini adalah dalam proses penggunaannya lebih mudah dibanding dengan metode lainnya, tidak memerlukan peralatan yang rumit, hasilnya sangat terlihat jelas serta sangat ekonomis, Namun metode ini juga memiliki kekurangan yaitu hasil untuk ukuran zona bening yang nantinya akan terbentuk tergantung oleh kondisi dari inkubasi, inokulum, predifusi serta dari aspek ketebalan dari medium itu sendiri yang akan mempengaruhi hasil sehingga akan menurunkan kepekaan dari metode cakram ini (Pelczar, 1988).

### **2.9.2 Metode Dilusi**

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat antimikroba. Prinsip dari metode Dilusi Tabung yaitu menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya seri

tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung (Dzen et al., 2003).

Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari obat. Selanjutnya (pada dilusi agar) biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KHM dari obat terhadap bakteri uji (Dzen et al., 2003).

Prinsip metode ini adalah pengenceran antibiotik sehingga diperoleh beberapa konsentrasi obat yang ditambah suspensi kuman dalam media. Sedangkan pada dilusi padat, tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar lalu ditanami kuman dan diinkubasi. Pada metode ini yang diamati adalah ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri atau kuman atau jika mungkin, tingkat kesuburan dari pertumbuhan kuman, dengan cara menghitung jumlah koloni, maka dapat ditentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM), (Jawetz et al., 2012).

Macam – macam metode dilusi :

(1) Metode lubang/ silinder (perforasi)

Untuk metode ini dibutuhkan suatu lubang atau silinder yang memiliki ukuran seragam (umumnya 8mm × 6mm × 10mm) dengan posisi pada permukaan agar diinokulasi pada cawan petri, kemudian diisi dengan sampel dan standar. Larutan senyawa yang nanti nya diuji akan berdifusi ke media agar sehingga menyebabkan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme. Zona hambat dapat diukur berdasarkan dari nilai konsentrasi hambat minimum (MIC) (Choma, 2010). Prinsip dari metode ini adalah bakteri uji yang umurnya 18-24 jam yang telah disuspensikan kedalam media agar dengan pada suhu 45 °C, lalu suspensi bakteri dituangkan kedalam cawan petri steril. Setelah agar memadat, buatlah lubang-lubang dengan diameter sekitar 6-8 mm. setelah dibuat lubang lalu masukan larutan yang akan diuji aktivitasnya, sebelumnya inkubasi terlebih dahulu pada suhu 27°C selama 18-24 jam. Selanjutnya didapat aktivitas antibakteri berdasarkan

diameter zona hambat yang didapat pada metode lubang atau silinder (Choma, 2010).

#### (2) Metode cakram kertas

Zat yang akan diuji diserapkan ke dalam cakram kertas dengan cara meneteskan larutan antibakteri pada cakram kertas kosong (mencelupkan kertas saring ke dalam larutan senyawa) dalam jumlah tertentu dengan kadar tertentu. Kertas cakram diletakan diatas permukaan agar padat yang telah diolesi bakteri, selanjutnya kertas cakram diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37 °C. Dari hasilnya nanti akan diketahui daerah hambat dari sekeliling cakram kertas untuk menentukan seberapa besar zona hambat yang memberikan aktivitas sebagai antibakteri dari sampel yang diuji (Ngaisah, 2010; Choma, 2010).

### **2.9.3 Metode Bioautografi**

Bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, antiprotozoa, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambatan di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji (Harborne, 1987).

Biautografi dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba, sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif (Mauchaza, 2016).

### **2.10 Tinjauan Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi yaitu prosedur pemisahan zat berkhasiat dan zat lain dalam sediaan, dengan proses penyarian berfraksi, penyerapan, atau penukaran ion pada

zat berpori, menggunakan cairan atau gas yang mengalir. Kromatografi memiliki banyak jenis, salah satunya yaitu kromatografi lapis tipis (KLT). KLT termasuk kromatografi planar yang di dalamnya juga ada kromatografi kertas dan elektroforesis. KLT digunakan dapat digunakan untuk pemisahan zat secara cepat, dengan menggunakan zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca. Lempeng yang di lapis, dapat dianggap sebagai “kolom kromatografi terbuka dan pemisahan berdasarkan pada penyerapan, pembagian atau gabungannya, tergantung jenis penyerap dan cara pembuatan lapisan zat penyerap dan jenis pelarut (Narwal, 2009; Depkes RI, 1989).

Untuk mengetahui kesesuaian zat yang diuji dengan pembanding maka bisa dilakukan dengan menghitung nilai  $R_f$  (retention factor). Perhitungan nilai  $R_f$  suatu senyawa yang diuji dan senyawa pembanding harus dilakukan pada plat yang sama. Nilai  $R_f$  dari suatu senyawa akan tetap konstan dari satu penelitian ke penelitian lainnya hanya jika kondisi kromatografi berikut juga konstan:

1. Sistem pelarut
2. Adsorben
3. Ketebalan adsorben
4. Jumlah zat yang ditotolkan
5. Temperatur (suhu)

(Stahl, 1985)

### **2.10.1 Fase Gerak**

Fase gerak merupakan pelarut tunggal atau campuran yang bergerak melewati fase diam (menyerap ke dalam fase diam) sebagai hasil dari gaya kapiler. Fase gerak ini dikenal juga dengan istilah eluen. Kecocokan pelarut pada kromatografi diklasifikasikan berdasar kekuatan eluasi (kepolaran). Ukuran utama dari tingkat kepolaran dilihat dari konstanta dielektrik (DC). Parameter lain seperti tegangan permukaan, viskositas, dan tekanan uap juga digunakan sebagai karakteristik pelarut. Saat pelarut sudah mencapai bagian atas plat maka plat diangkat dari chamber, dikeringkan dan campuran komponen senyawa terpisah dapat di visualisasikan (Narwal, 2009).

### 2.10. 2 Fase Diam

Fase diam merupakan lapisan partikel padat yang tersebar merata dengan bantuan menggunakan gelas, alumunium, atau lembaran plastik setipis kurang lebih 0,25 mm. Penambahan bahan pengikat seperti gipsum, yang digabungkan dengan fase diam agar potongan lempeng menjadi lebih baik. beberapa fase diam ditambahkan dengan bubuk fliuresen untuk mempermudah visualisasi lebih lanjut (misalnya berwarna hijau terang saat fase diam disinari UV 254 nm). Ada beberapa fase diam, diantaranya silika gel taktermodifikasi, Nano-TLC atau HPTLC, silika gel yang dimodifikasi (RP-18 modifikasi siral, amino, cyano), alumunium oksida, selulosa (serat, mikrokristalin), poliamida (Narwal, 2009).

